

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

SUZANNY OLIVEIRA MENDES

**PERFIL DA EXPRESSÃO DE HIF-1 α EM CÉLULAS
LINFOIDES DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO
PERITUMORAL E INTRATUMORAL COMO MARCADOR
PROGNÓSTICO DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE
CAVIDADE ORAL**

VITÓRIA

2014

SUZANNY OLIVEIRA MENDES

**PERFIL DA EXPRESSÃO DE HIF-1 α EM CÉLULAS
LINFOIDES DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO
PERITUMORAL E INTRATUMORAL COMO MARCADOR
PROGNÓSTICO DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE
CAVIDADE ORAL**

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, como exigência para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.”

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti.

Co-orientador: Prof. Dr. Iuri Drumond Louro.

VITÓRIA

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Mendes, Suzanny Oliveira, 1989-

M538p Perfil da expressão de HIF-1 α em células linfoides do infiltrado
inflamatório peritumoral e intratumoral como marcador prognóstico do
carcinoma epidermoide de cavidade oral / Suzanny Oliveira Mendes. –
2014.

54 f. : il.

Orientador: Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti.

Coorientador: Iuri Drumond Louro.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Biologia Molecular. 2. Imunologia. 3. Neoplasias.
4. Carcinoma de Células Escamosas. 5. Imuno-histoquímica. I.
Conforti, Adriana Madeira Álvares da Silva. II. Louro, Iuri Drumond. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde.
IV. Título.

CDU: 61

SUZANNY OLIVEIRA MENDES

**PERFIL DA EXPRESSÃO DE HIF-1 α EM CÉLULAS
LINFOIDES DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO
PERITUMORAL E INTRATUMORAL COMO MARCADOR
PROGNÓSTICO DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE
CAVIDADE ORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 21 de Fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª. Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti.
Universidade Federal do Espírito Santo
(Orientadora)

Profª. Drª. Flavia Imbroisi Valle Errera
Escola Superior de Ciências da Santa Casa de
Misericórdia de Vitória (EMESCAM)
(Membro Interno)

Profª . Drª. Kristianne Porta Santos Fernandes
Universidade Nove de Julho
(Membro Externo)

*“À minha amada família, vocês são tudo para
mim.”*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me abençoado e me iluminado tanto não só durante a minha pesquisa, mas por toda a minha vida.

À professora Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti, minha querida orientadora, por todos os anos de ensinamento, experiência, amor e carinho.

Ao professor Dr. Iuri Drumond Louro, agradeço imensamente pela co-orientação e pelo apoio profissional.

À professora Dra. Flávia Imbroisi Valle Errera, e professora Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes por terem gentilmente aceitado participar da minha banca e contribuir com a minha pesquisa.

À minha mãe Wagna Gomes de Oliveira Mendes, irmã Samylla Oliveira Mendes e demais familiares, pelo apoio emocional e pelo fortalecimento em toda esta árdua e gratificante trajetória.

À Universidade Federal do Espírito Santo por ter me proporcionado estes sete anos de estudo, que me possibilitaram um amadurecimento profissional e por todo o conhecimento que adquiri.

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia pela oportunidade de ter cursado um mestrado em um programa de pós-graduação respeitado.

À CAPES pelo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa.

Ao professor Me. Leonardo Oliveira Trivilin, por todos esses anos de orientação que contribuíram para a minha pesquisa.

Ao professor Me. Marcelo dos Santos, pelo auxílio no desenvolvimento do presente trabalho.

À Professora Dra. Louisiane de Carvalho Nunes e professora Dra. Jankerle Neves Boeloni, por toda a ajuda e o apoio fundamentais que me proporcionaram durante a pesquisa.

Aos amigos do NGHM (Núcleo de Genética Humana e Molecular), por compartilharem de diversos momentos no ambiente de trabalho e pelos anos de companheirismo.

Aos amigos da PPG Biotecnologia, em especial Isabela Bastos Binotti Abreu de Araujo por ter compartilhado comigo estes dois anos de experiência e por terem me auxiliado em momentos cruciais do desenvolvimento da pesquisa.

Aos amigos do curso de Ciências Biológicas, pela agradável convivência, amizade, carinho, compreensão e apoio para o sucesso do presente trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Animal do HOVET, em especial Fabiana Bravo, pela receptividade, auxílio e por todo o apoio durante a parte experimental.

Ao Deivison Mozer de Souza, amor da minha vida, por ter me dado toda a força, apoio, consolo, conforto e ajuda que pude ter, essencial para a concretização deste trabalho.

A todos os amigos que contribuíram direta e indiretamente para o sucesso deste trabalho.

Serei sempre muito grata a todos!

“O saber a gente aprende com os mestres e com os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.”

Cora Coralina

RESUMO

O complexo transcricional HIF-1 é responsável por controlar a transcrição de mais de 100 genes envolvidos em resposta celular a hipóxia. A subunidade HIF-1 α é estabilizada em condições de hipóxia e dimeriza-se com uma subunidade HIF-1 β , formando o complexo HIF-1 transcionalmente ativo. Em células inflamatórias, uma elevada expressão de HIF-1 α pode induzir os linfócitos à imunossupressão, reduzindo o reconhecimento dos antígenos tumorais, permitindo o crescimento tumoral. O presente trabalho objetivou investigar a relação entre a expressão de HIF-1 α em linfócitos do infiltrado inflamatório intratumoral e peritumoral de 56 pacientes com carcinoma epidermoide de cavidade oral. Os resultados indicaram um valor prognóstico para esta expressão. Uma elevada expressão da HIF-1 α em células do infiltrado inflamatório peritumoral foi significativamente relacionada com o pior prognóstico do paciente, enquanto esta elevada expressão nos linfócitos na região intratumoral foi correlacionado com um melhor prognóstico. Um perfil de risco indicando a chance para a recidiva e óbito foi desenhado baseado na expressão de HIF-1 α nos linfócitos do infiltrado inflamatório peritumoral e intratumoral, definindo os riscos baixo, intermediário e alto. Este perfil de risco foi hábil para determinar que a expressão forte de HIF-1 α nos linfócitos peritumorais são relacionados com um pior prognóstico, independente da expressão nas células intratumorais. A expressão fraca de HIF-1 α nos linfócitos peritumorais e forte nos linfócitos intratumorais foram considerados um perfil de baixo risco, mostrando nenhum caso de recidiva da doença e óbito decorrente da doença. O risco intermediário foi associado com baixa expressão de HIF-1 α tanto em infiltrado inflamatório intratumoral como peritumoral. Estes resultados sugerem que a expressão da HIF-1 α em células linfóides do infiltrado inflamatório intratumoral e peritumoral pode exercer um papel importante como um marcador prognóstico tumoral.

ABSTRACT

The HIF-1 transcriptional complex is responsible for controlling transcription of over 100 genes involved in cell hypoxia response. HIF-1 α subunit is stabilized in hypoxia conditions, dimerizes with HIF-1 β forming the active HIF-1 transcriptional factor. In inflammatory cells, high HIF-1 α expression might induce lymphocytic immunosuppression, decreasing tumoral antigen recognition, allowing tumor growth. The present work aimed to investigate the relationship between HIF-1 α expression in lymphocytes inflammatory infiltrate from intratumoral and peritumoral region of 56 patients with oral cancer. Data indicates a prognostic value for this expression. High HIF-1 α expression in peritumoral inflammatory cells was significantly related to worse patient outcome, whereas high expression in the intratumoral lymphoid cells correlates with a better prognosis. A risk profile indicating the chance of disease relapse and death was designed based on HIF-1 α expression in inflammatory infiltrate cells, defining low, intermediate and high risks. This risk profile was able to determine that high HIF-1 α expression in peritumoral lymphocytes correlates with worse prognosis, independently of intratumoral inflammatory infiltrate expression. Low HIF-1 α in peritumoral lymphocytes and high expression in the intratumoral lymphocytes was considered a low risk profile, showing no cases of disease relapse and disease related death. Intermediate risk was associated with low HIF-1 α expression in inflammatory infiltrate intratumoral and peritumoral. in tumor and tumor margins. These results suggest that HIF-1 α expression in tumor and peritumoral inflammatory cells may play an important role as prognostic tumor marker.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Os domínios bHLH e PAS da HIF-1 α mediam a dimerização com a proteína HIF-1 β e a ligação do complexo ao DNA. Os domínios N-TAD e C-TAD são requeridos para hidroxilação da proteína HIF-1 α e também para a ativação da transcrição gênica. As interações proteína-proteína são indicadas por setas para os dois sentidos. Modificado de Sitkovsky e Lukashev (2005).22
- Figura 2** – Na presença do oxigênio a proteína PHD hidroxila o domínio ODD da HIF-1 α , em seguida é reconhecida pela pVHL para posterior degradação proteossomal.22
- Figura 3** – Esquema de formação do Complexo HIF-1 em condições de hipóxia, em que a proteína PHD em conjunto com a proteína pVHL não são responsáveis pela degradação da HIF-1 α , a qual se transloca para o núcleo e se dimeriza à HIF-1 β para compor o complexo HIF-1.23
- Figura 4** – Regulação (in)dependente de O₂ de HIF-1 α no microambiente inflamatório. Múltiplos sinais afetam transcrição, tradução ou modificações pós-traducionais de HIF-1 α . Estes múltiplos sinais, exemplificado por macrófagos, afetam a quantidade de proteína HIF-1 α , a atividade da HIF-1 e concomitantemente genes alvo de expressão. Vias que bloqueiam a atividade da PHD são marcadas em vermelho. Vias de sinalização que conduzem à formação do heterodímero HIF-1 α /HIF-1 β ativo são mostrados em azul. Fonte: DEHNE e BRUNE, 2009.25
- Figura 5** – Fotomicrografia com aumento de 400 vezes de margem cirúrgica de pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral. Tipos de intensidade de marcação de Linfócitos para a proteína HIF-1 α , com os linfócitos imunorreativos são marcados por setas e as células neoplásicas são marcadas por asteriscos. A) A figura apresenta alguns linfócitos sem marcação B) Linfócitos fracamente marcados C) Linfócitos moderadamente marcados D) Linfócitos fortemente marcados.31
- Figura 6** – Fotomicrografia de margem cirúrgica de carcinoma oral. A - expressão forte de HIF-1 α em células linfóides do infiltrado inflamatório peritumoral. B – expressão fraca de HIF-1 α em células linfóides do infiltrado peritumoral.33
- Figura 7** – Curva de sobrevida livre de doença segundo a expressão de HIF-1 α em células linfóides do infiltrado inflamatório peritumoral.35
- Figura 8** – Curva de sobrevida doença-específica de acordo com a expressão de HIF-1 α em células linfóides do infiltrado inflamatório peritumoral.36
- Figura 9** – Fotomicrografia de infiltrado inflamatório intratumoral. A - expressão forte de HIF-1 α em células linfóides do infiltrado inflamatório intratumoral. B – expressão fraca de HIF-1 α em células linfóides do infiltrado intratumoral.37

Figura 10 – Curva de sobrevida livre de doença segundo a expressão de HIF-1 α em células linfoides do infiltrado inflamatório intratumoral.	38
Figura 11 – Curva de sobrevida doença específica de acordo com a expressão de HIF-1 α em células linfoides do infiltrado inflamatório intratumoral.	38
Figura 12 - Sobrevida livre de doença de acordo com o perfil de risco HIF-1 α	40
Figura 13 - Sobrevida doença específica de acordo com o perfil de risco HIF-1 α . ..	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clinicopatológicas e sua relação com a expressão da HIF-1 α nas células linfoides do infiltrado inflamatório, intratumoral e peritumoral.....	34
Tabela 2 - Perfil de risco HIF-1 α e sua correlação com recidiva e morte.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT – Serina/Treonina quinase, também conhecida como Protein Kinase B (PKB)

APCs – *Antigen Presenting Cells* (Células Apresentadoras de Antígeno)

ARNT – *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator* (Translocador receptor de aril hidrocarboneto nuclear)

bHLH – *basic helix-loop-helix* (Hélice-Alça-Hélice)

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

C-TAD – Domínio C-terminal

CTLs – *Cytotoxic T Lymphocytes* (Linfócitos T Citolíticos)

cTNM – *clinic Tumor, Node, Metastasis* (Tumor, Nódulos, Metástase - clínico)

FIH – Fator de inibição da HIF

HIF -1 – *Hypoxia-inducible factor 1* (Fator induzível por hipóxia -1)

HIF-1 α – *Hypoxia-inducible factor 1 alpha* (Fator induzível por hipóxia -1 alpha)

HIF-1 β – *Hypoxia-inducible factor 1 beta* (Fator induzível por hipóxia -1 beta)

HPV – *Human Papilloma Virus* (Papiloma Vírus Humano)

HREs – *Hypoxia response element* (Elementos Responsivos à hipóxia)

IL – Interleucina

INCA – Instituto Nacional do Câncer

mRNA – *Ribonucleic Acid* (ARNm – Ácido ribonucleico mensageiro)

N-TAD – Domínio N-terminal

NF- κ B – *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (Fator nuclear da cadeia kappa de células B)

NO – espécie reativa de nitrogênio

N-TAD – Domínio N terminal

O₂ – oxigênio

ODD – *Oxygen-dependent degradation* (Domínio de degradação regulado por oxigênio)

OS-9 – OS-9 – Osteosarcoma amplified 9

PAS – Per-ARNT-Sim

PHD – Prolil Hidroxilase

PI3K – Phosphatidylinositol-3-kinase

pTNM – *pathologic Tumor, Node, Metastasis* (Tumor, Nódulos, Metástase – patológico)

pVHL – proteína Von Hippel-Lindau

ROS – *Reactive Oxygen Specie* (Espécie Reativa de Oxigênio)

SSAT2 – *Spermidine/spermine-N-acetyl-transferase 2*

TAD – Domínio de transativação

TGF – *Transforming Growth Factor*

TNF α – Fator de Necrose Tumoral

TNM – *Tumor, Node, Metastasis* (Tumor, Nódulos, Metástase)

VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor* (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Aspectos gerais e epidemiológicos do câncer de cabeça e pescoço	16
1.2. Resposta imunológica e neoplasias	18
1.3. Hipóxia	20
1.4. HIF-1 α	21
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo Geral	27
2.2. Objetivos Específicos	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Ética	28
3.2. Casuística	28
3.3. Amostras	29
3.4. Confeção do <i>Tissue Microarray</i> (TMA)	29
3.5. Imuno-histoquímica	30
3.6. Análise de Expressão	31
3.7. Análise Estatística	32
4. RESULTADOS	33
4.1. Expressão de HIF-1 α no infiltrado inflamatório linfocitário peritumoral	33
4.2. A Expressão da HIF-1 α no infiltrado inflamatório linfocitário intratumoral	36
4.3. Perfil HIF-1 α linfocitário	39
4. DISCUSSÃO	42
5. CONCLUSÕES	46
6. REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais e epidemiológicos do câncer de cabeça e pescoço

O câncer de cabeça e pescoço é uma causa significativa de mortalidade e morbidade em todo o mundo, apresentando aproximadamente 600 mil novos casos por ano (BAUMAN, MICHEL E CHUNG, 2012), esta doença representa 10% dos tumores malignos a nível mundial (ALVARENGA *et al.*, 2008) e constitui a sexta causa mundial de morte por câncer (LIM E CHOI, 2008). Dentre estes, os tumores da cavidade oral contribuem com 389 mil novos casos por ano, com uma taxa de mortalidade de 50% (FERLEY *et al.*, 2010).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), os tumores malignos de cavidade oral acometem mais frequentemente indivíduos do sexo masculino. No Brasil, estima-se aproximadamente 14 mil novos casos de câncer de cavidade oral por ano, com taxas de 9.990 para o sexo masculino e 4.180 para o sexo feminino (INCA, 2012). Embora essa neoplasia atinja preferencialmente os pacientes do sexo masculino, nos últimos anos houve um aumento notável na incidência entre mulheres, o que deve refletir a mudança nos hábitos tabagistas e etilistas destas (INCA 2010; INCA 2012).

Sabe-se que existe uma relação positiva entre o consumo de tabaco e álcool e o aparecimento de tumores na cavidade oral (ALVARENGA *et al.*, 2008), de modo que indivíduos tabagistas apresentam um risco cinco vezes maior de desenvolver câncer oral do que não tabagistas, sendo que este risco é potencializado quando o uso do tabaco é concomitante ao uso do álcool (FORASTIERE *et al.*, 2001; GILLISON, 2007), e mesmo em indivíduos com um tumor já diagnosticado, a persistência do tabagismo e do etilismo diminui o índice de cura do paciente e aumenta a ocorrência de um segundo tumor (INCA, 2001).

Além do hábito tabagista e etilista, outros fatores de risco são apresentados pela população atingida por esta neoplasia como a condição socioeconômica do paciente, limitação de recursos, baixa renda e escolaridade, alimentação deficiente e dificuldade de acesso ao serviço de saúde, o que propicia uma ausência de informação e tratamento aos indivíduos que venham a ser acometidos por uma lesão pré-neoplásica de cavidade oral, permitindo, posteriormente o desenvolvimento de um tumor lesivo (FREEMAN, 2004; WARD, 2004).

Do ponto de vista epidemiológico, estudos revelam que a maioria dos casos de câncer de cavidade oral no Brasil ocorre em indivíduos brancos, seguidos por pardos, e em menor porcentagem, os negros (MILLER E RAYENS, 2003). Entretanto, este predomínio de indivíduos brancos acometidos por esta doença, em muitos casos, não pode ser considerado categórico, em virtude da ampla miscigenação da população (CARVALHO *et al.*, 2001).

Em relação à idade dos pacientes acometidos, em grande parte são indivíduos com idade acima de 50 anos independente do gênero (GILLISON, 2007), entretanto, a ocorrência vem aumentando em indivíduos mais jovens em virtude da infecção pelo papilomavírus humano (HPV), um vírus conhecido por induzir transformação neoplásica (MACHADO *et al.*, 2003).

Estes fatores ambientais e hábitos de vida do paciente, em grande parte, são responsáveis pelo surgimento de lesões multifocais na cavidade oral, apresentando alterações pré-neoplásicas culminando com o tumor oral (BRAAKHUIS *et al.*, 2003; SALNIKOW *et al.*, 2000; SLAUGHTER, SOUTHWICK E SMEJKAL, 1953; SZABO, 1999). Esta tumorigênese, pode se originar pelo acúmulo de alterações genéticas que ocorrem no tecido ao longo do tempo, levando o tecido normal a se desenvolver e tornar-se um tumor lesivo (FEARON E VOGELSTEIN, 1990).

Dentre os tipos de tumores malignos de cavidade oral, o carcinoma epidermóide é a variante histológica mais frequente, alcançando uma taxa de 90% dos casos (CURADO E HASHIBE, 2009). O carcinoma epidermoide de cavidade oral é uma neoplasia maligna que se origina do epitélio de revestimento, e também pode ser denominado carcinoma de células escamosas, carcinoma escamocelular e carcinoma espinocelular (BRENNER *et al.*, 2007).

A classificação clínica de tumores da cavidade oral tem sido padronizada pelo sistema de estadiamento clínico de tumores TNM (LOURENÇO *et al.*, 2006). As características analisadas pelo TNM consistem em três categorias: T – as características do tumor no sítio primário (com base no tamanho, localização ou ambos); N – o grau de comprometimento dos linfonodos regionais e M – a ausência ou presença de metástase à distância (DESCHLER E DAY, 2008). Para o estadiamento clínico (cTNM) são realizados exames clínicos e de imagem, e caso o paciente seja submetido à ressecção cirúrgica, determina-se o estágio patológico (pTNM) por meio do exame histopatológico do tumor (PATEL E SHAH, 2005).

O exame histopatológico baseia-se na observação de anaplasias celulares, interface entre as células tumorais e o tecido normal, invasividade do tumor, margens tumorais, além da detecção de infiltrado de células inflamatórias no tecido, entre outros parâmetros (LOURENÇO *et al.*, 2006).

Em 1863, Rudolph Virchow relatou pela primeira vez a presença de células inflamatórias no tecido neoplásico (MACARTHUR, HOLD E EL-OMAR, 2004). Desde então, a inflamação tem sido relacionada ao câncer em muitos aspectos do comportamento tumoral, como inibidora e favorecedora do crescimento de células transformadas (MANTOVANI *et al.*, 2008). O infiltrado inflamatório tumoral, que é observado em vários tipos de tumor, possui um significado clínico melhor compreendido em tumores de mama e colorretais (MOHAMED *et al.*, 2012; TOUGERON *et al.*, 2013), sendo interpretados no laudo patológico como fatores preditivos de prognóstico.

1.2. Resposta imunológica e neoplasias

Desde a década de 1860 supunha-se que houvesse uma função fisiológica do sistema imunológico adaptativo, em evitar o crescimento de células transformadas ou em seu envolvimento na destruição destas antes que se tornassem tumores malignos. Atualmente a literatura de fato reconhece o papel do sistema imunológico

na resposta contra o crescimento e desenvolvimento de tumores. Por outro lado, um sistema imunológico ineficiente pode permitir o crescimento e desenvolvimento de tumores (INCA, 2001).

Esta função do sistema imunológico é denominada vigilância imunológica, na qual tumores malignos podem ser reconhecidos por meio dos diversos antígenos tumorais, como proteínas modificadas, produtos de oncogenes ou de genes supressores de tumor, ou em grande parte, proteínas que são expressas em excesso ou de forma aberrante (ABBAS, LICHTMAN E PILLAI, 2007).

O reconhecimento do corpo estranho induz um complexo programa de células imunológicas, as quais são designadas para matar e remover os invasores (DEHNE e BRUNE, 2009). Assim, as respostas tumorais em geral são induzidas pelo reconhecimento desses antígenos tumorais por células denominadas Células Apresentadoras de Antígeno (APCs), a qual inclui macrófagos e células dendríticas. (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2007).

Ao reconhecer uma célula neoplásica, estas são englobadas pelas APCs profissionais do hospedeiro e os antígenos de células tumorais são processados e exibidos na superfície das APCs, assim os antígenos tumorais podem ser reconhecidos por diversas subpopulações de Células Linfoides, incluindo Linfócitos T auxiliares e Linfócitos T citolíticos (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2007).

O principal mecanismo imunológico de erradicação tumoral é a eliminação das células tumorais pelos linfócitos T citolíticos (CTLs) ativados para os antígenos tumorais. Após a ativação destas células, estas passarão a expressar citocinas citolíticas que desencadearão um processo de morte das células tumorais (ABBAS, LICHTMAN E PILLAI, 2007). Entretanto por outro lado, este mecanismo pode ser ineficiente em algumas situações de resposta imunológica deficitária ou porque alguns tumores esquivam-se do ataque imunológico (ABBAS, LICHTMAN E PILLAI, 2007).

Estas respostas inflamatórias a corpos estranhos normalmente ocorrem em microambientes hipóxicos, uma vez que em locais de inflamação o consumo de O_2 é muito elevado, enquanto o suprimento sanguíneo é interrompido em virtude dos vasos obstruídos por fagócitos ou vasoconstritos por citocinas, gerando uma baixa

taxa de oxigênio no tecido em questão (SITKOVSKY E LUKASHEV, 2005). Desta forma, o sucesso da eliminação das células neoplásicas demanda de um metabolismo eficiente das células imunológicas em todos os microambientes do tecido e requer uma adaptação dessas em reduzida disponibilidade de oxigênio ou hipóxia (DEHNE E BRUNE, 2009; SEMENZA, 2003).

1.3. Hipóxia

A hipóxia é um componente importante de várias doenças, incluindo acidente vascular cerebral, doenças inflamatórias e a progressão de tumores sólidos (RANTANEN *et al.*, 2008). Esta baixa tensão de oxigênio tem sido demonstrada em vários tecidos normais, inflamados e tumorais (DEHNE E BRUNE, 2009; SEMENZA 1999) e pode prejudicar o metabolismo, uma vez que células humanas necessitam de suprimentos adequados de oxigênio para a obtenção de energia (SEМЕНZA, 2012a). Desta forma há uma necessidade de controle da homeostase do oxigênio para manutenção da fisiologia e bioquímica celular, essenciais para a sobrevivência da célula, assim, as concentrações de oxigênio devem ser rigidamente controladas (SEМЕНZA, 2012b).

Neste contexto, células de mamíferos desenvolveram uma maquinaria molecular para determinar a sobrevivência celular sob condições de hipóxia ou de entrada em apoptose (BRUICK E MCKNIGHT, 2001; EPSTEIN *et al.*, 2001). Assim, para a manutenção da homeostase do oxigênio, muitos organismos eucariotos adaptaram um mecanismo especializado para regulação e distribuição do mesmo. Esta via responsiva dependente de oxigênio foi conservada e está presente em quase todas as células de mamíferos (BRUICK, 2003; STIEHL *et al.*, 2006).

O Complexo HIF-1 (*Hypoxia Inducible factor*) é o principal mecanismo regulador da homeostase celular e sistêmica e age como fator de transcrição para expressão de

mais de 100 genes envolvidos na resposta celular à hipóxia, essenciais para a sobrevivência de células em condições de baixas taxas de oxigênio, assim como de genes de metabolismo celular, angiogênese, eritropoiese, transporte de glicose, glicólise, entre outros (SEMENZA, 2012b).

Este complexo transcricional é um heterodímero proteico composto por duas subunidades, HIF-1 α e HIF-1 β também conhecida como *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT), ambas pertencentes à família de proteínas *basic helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim* (bHLH-PAS) (KAELIN E RATCLIFFE, 2008). A subunidade HIF-1 β é constitutivamente expressa, com níveis de mRNA e de proteína constantes na célula. Entretanto a expressão da subunidade HIF-1 α é constantemente suprimida na presença de O₂. Sua transcrição e síntese proteica são constitutivas e particularmente não são afetadas pelo teor de oxigênio (WANG E SEMENZA, 1993), porém a presença do oxigênio atua na regulação da HIF-1 α por modificações pós-traducionais, como hidroxilação e ubiquitinação para que ela seja degradada pelo sistema proteossomal (BRAHIMI-HORN, MAZURE E POUYSSSEGUR, 2005).

1.4. HIF-1 α

A proteína HIF-1 α possui domínios como o PAS (*Per-ARNT-Sim*), o qual interage com o domínio PAS da HIF-1 β para dimerização (CHOWDHURY, HARDY e SCHOFIELD, 2008). Existem também outros dois domínios localizados na porção N-terminal (N-TAD) e na C-terminal (C-TAD), os quais atuam na ativação da transcrição gênica. Tanto na porção N-terminal como na C-terminal existe o importante domínio, o ODD (*Oxygen-dependent degradation*) que atua na mediação da estabilidade da HIF-1 α de acordo com a disponibilidade de oxigênio, uma vez que neste domínio estão localizados sítios para a hidroxilação dependente de oxigênio (Figura 1) (PUGH *et al.*, 1997; RUAS, POELLINGER E PEREIRA, 2002).

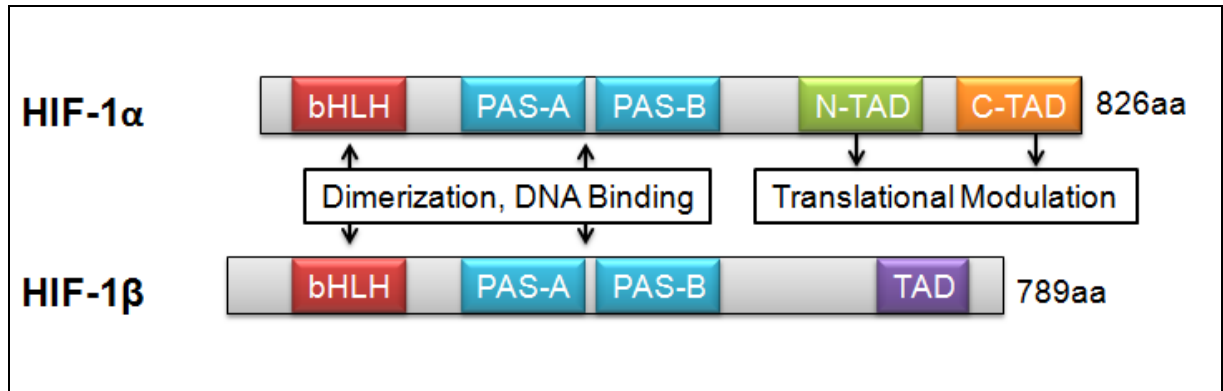


Figura 1 – Os domínios bHLH e PAS da HIF-1 α mediam a dimerização com a proteína HIF-1 β e a ligação do complexo ao DNA. Os domínios N-TAD e C-TAD são requeridos para hidroxilação da proteína HIF-1 α e também para a ativação da transcrição gênica. As interações proteína-proteína são indicadas por setas para os dois sentidos. Modificado de Sitkovsky e Lukashev (2005).

Em geral, a abundância de subunidade 1 α é primariamente regulada pela família de prolil hidroxilases chamadas PHD1, PHD2 e PHD3 (KAELIN E RATCLIFFE, 2008), porém existe uma gama de outras proteínas com funções reguladoras da HIF-1 α (DEHNE E BRUNE, 2009).

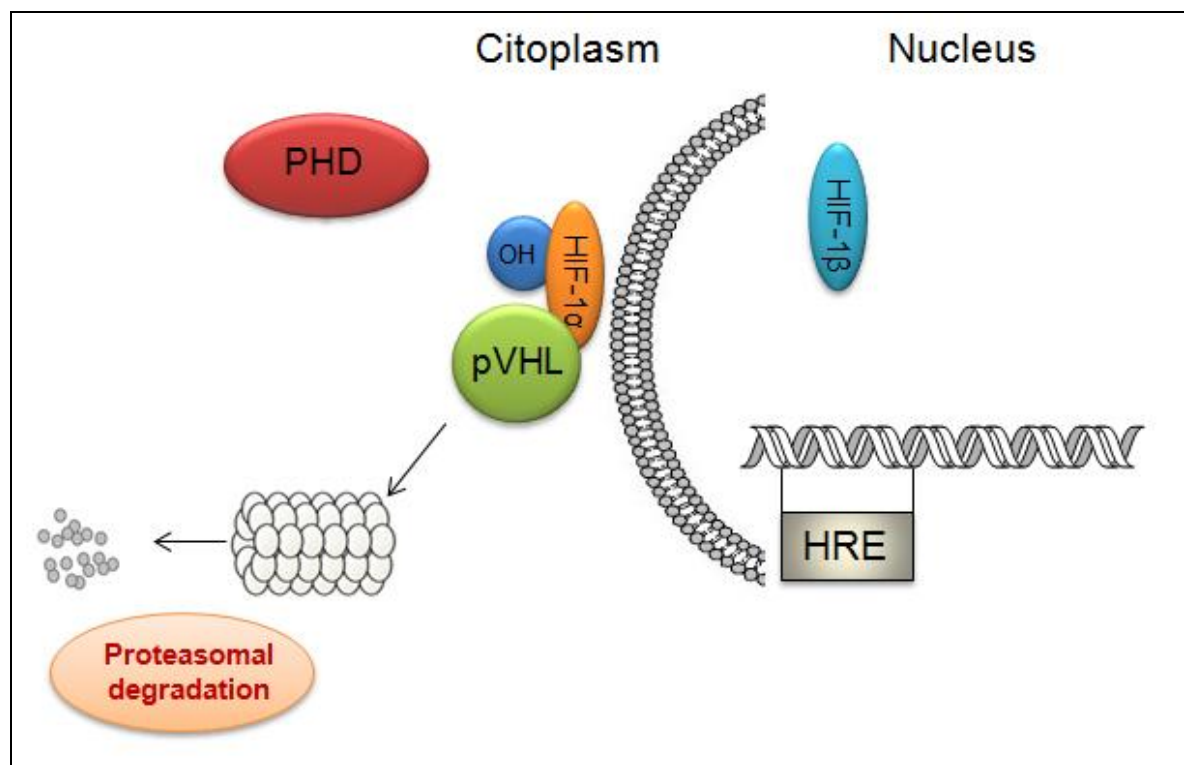


Figura 2 – Na presença do oxigênio a proteína PHD hidroxila o domínio ODD da HIF-1 α , em seguida é reconhecida pela pVHL para posterior degradação proteossomal.

Sob condições de normóxia, a proteína PHD utiliza o oxigênio como cofator enzimático e transfere um grupo hidroxila para o domínio ODD da HIF-1 α (KAELIN E RATCLIFFE, 2008). Após a hidroxilação, esta é reconhecida pela proteína supressora de tumor pVHL (von Hippel-Lindau), que recruta um complexo ubiquitina ligase para marcar a proteína HIF-1 α e promover sua degradação proteossomal (Figura 2) (BAEK *et al.*, 2005).

Algumas proteínas podem ainda estabilizar a supressão da expressão da HIF-1 α por meio de interações proteicas como a proteína OS-9 que se liga à PHD e à HIF-1 α facilitando a hidroxilação. Já a proteína SSAT2 estabiliza a interação entre a pVHL e a HIF-1 α , facilitando sua ubiquitinação (SITKOVSKY E LUKASHEV, 2005) e o FIH (fator de inibição da HIF) que hidroxila a porção C-terminal da HIF-1 α impedindo sua interação com co-ativadores essenciais para a atividade transcricional do complexo HIF-1 (KAELIN E RATCLIFFE, 2008; SITKOVSKY E LUKASHEV, 2005).

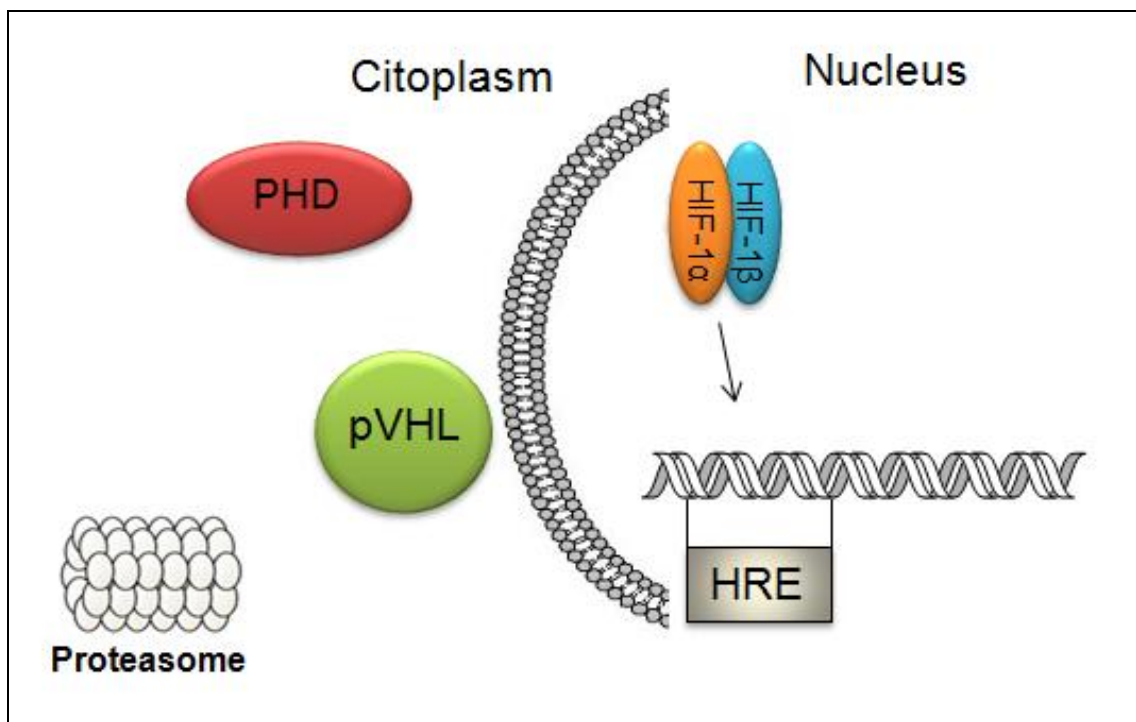


Figura 3 – Esquema de formação do Complexo HIF-1 em condições de hipóxia, em que a proteína PHD em conjunto com a proteína pVHL não são responsáveis pela degradação da HIF-1 α , a qual se transloca para o núcleo e se dimeriza à HIF-1 β para compor o complexo HIF-1.

Em condições de hipóxia, a atividade da proteína PHD decresce e a degradação da HIF-1 α é reduzida. Uma vez estabilizada, esta é translocada para o núcleo e se dimeriza com a subunidade HIF-1 β , formando o complexo HIF-1 transcricionalmente ativo, o qual irá reconhecer uma região no genoma chamada HRE (*hypoxia response elements*) ativando a transcrição de seus diversos genes alvo (Figura 3) (SCHARTE, 2003; SEMENZA, 1999).

Além disso, a atividade da PHD pode ser influenciada pela interferência do níquel presente no tabaco, podendo substituir o núcleo metálico desta proteína, resultando num menor nível de degradação da HIF-1 α (CHEN et al., 2009; SALNIKOW E ZHITKOVICH, 2008).

Além do seu papel na homeostase do oxigênio há evidências de um importante papel da HIF-1 α em reações imunológicas. Várias citocinas e outros mediadores inflamatórios têm sido descritos como envolvidos na promoção da expressão da proteína HIF-1 α , bem como a ligação do complexo HIF-1 ao DNA sob condições de hipóxia, ou até mesmo normóxia, para uma melhora da resposta inflamatória (SCHARTE et al., 2003).

Em microambientes inflamatórios, a ativação das células imunológicas promove a produção de uma variedade de citocinas como TNF- α e IL-1, além de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (NO) que também aumentam a expressão da HIF-1 α . De forma que na inflamação inicial, os macrófagos e neutrófilos produzem uma explosão de ROS, esta explosão é crítica para a ação antitumoral dos fagócitos, uma vez que a produção de ROS resulta num aumento de HIF-1 α , a qual irá participar na ativação de diversas vias responsáveis por aprimorar o metabolismo dessas células na resposta antitumoral (Figura 4) (DEHNE E BRUNE, 2009).

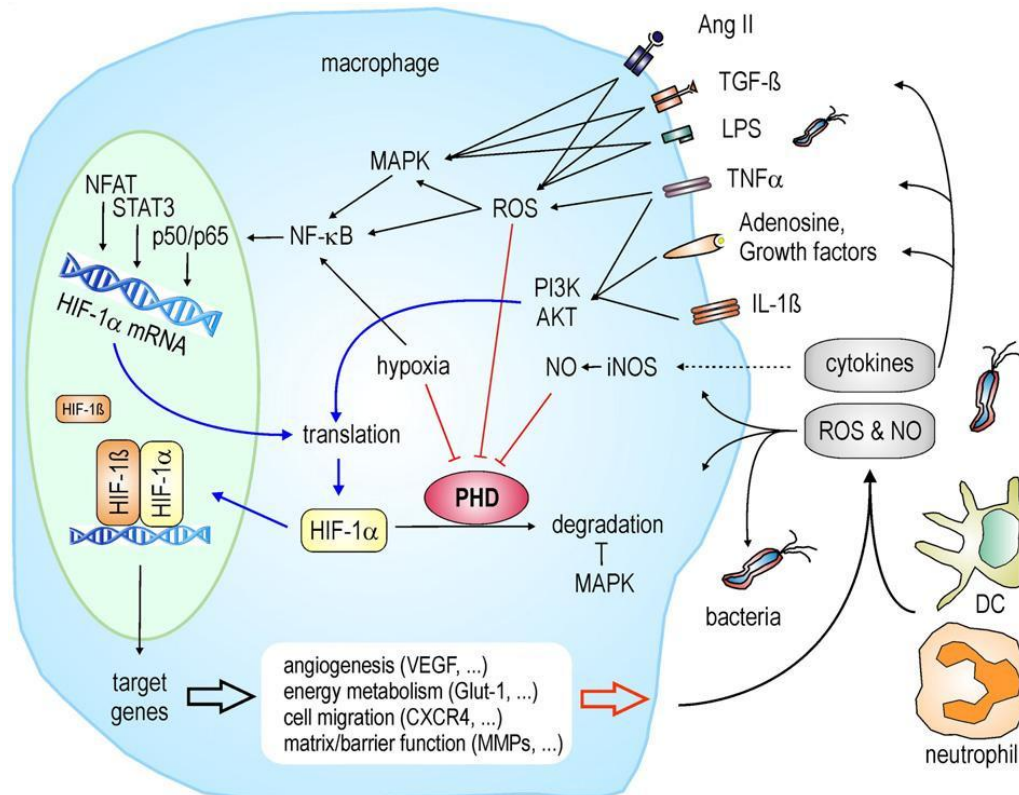


Figura 4 – Regulação (in)dependente de O_2 de HIF-1 α no microambiente inflamatório. Múltiplos sinais afetam transcrição, tradução ou modificações pós-traducionais de HIF-1 α . Estes múltiplos sinais, exemplificado por macrófagos, afetam a quantidade de proteína HIF-1 α , a atividade da HIF-1 e concomitantemente genes alvo de expressão. Vias que bloqueiam a atividade da PHD são marcadas em vermelho. Vias de sinalização que conduzem à formação do heterodímero HIF-1 α / HIF-1 β ativo são mostrados em azul. Fonte: DEHNE e BRUNE, 2009.

Uma consequência do aumento de ROS é a oxidação do Fe(II) no sítio catalítico das PHDs, ocasionando bloqueio de sua atividade, sendo assim, a PHD não irá hidroxilar a HIF-1 α para que ela seja degradada (GERALD *et al.*, 2004). Outra possibilidade é que ROS iniba as prolil hidroxilases pela oxidação irreversível do sítio ativo de aminoácidos, com resíduos de histidina, resultado na inativação da enzima por oxidação induzida. Portanto essas considerações implicam que, um aumento de ROS durante a inflamação pode contribuir para um acúmulo de HIF-1 α e a ativação do complexo HIF-1 nas células mieloides (DEHNE E BRUNE, 2009; KAELEN E RATCLIFFE, 2008).

Adicionalmente, o NO atenua a ubiquitinação da HIF-1 α e atua na redução da atividade da PHD pela alteração do Fe(II) do sítio catalítico destas. Como resultado, ocorre a estabilização da HIF-1 α (BRUNE E ZHOU, 2007). Também foi proposto que

o aumento da expressão da PI3K aumenta os níveis de HIF-1 α em resposta ao NO (BRUNE E ZHOU, 2007). Além disso, espécies ROS e NO, ativam vias a partir de TNF- α e IL-1 β , que induzirão a produção de PI3K e/ou NF- κ B que por sua vez, irão ativar o complexo HIF-1 (BRUNE E ZHOU, 2007; HELLWIG-BÜRGEL, *et al.*, 1999).

Os efeitos da proteína HIF-1 α em células tumorais já foram descritos e relacionados com o prognóstico (KAYA *et al.*, 2012; DONG *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2012), entretanto não há muitos dados na literatura acerca da expressão da HIF-1 α em linfócitos, tampouco sua expressão em infiltrado inflamatório tumoral (MENDES *et al.*, 2014; THIEL *et al.*, 2007). Essa questão pode ser importante devido à relação entre a HIF-1 α , microambiente tumoral e inflamatório (SITKOVSKY E LUKASHEV, 2005; THIEL *et al.*, 2007) e também a sua relação com a sobrevida de pacientes (MENDES *et al.*, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a expressão da proteína HIF-1 α em linfócitos na região peritumoral e intratumoral de carcinoma epidermoide de cavidade oral.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a relação da expressão da proteína HIF-1 α em linfócitos do infiltrado inflamatório peritumoral e intratumoral de carcinoma epidermoide de cavidade oral com as características clinico-epidemiológicas dos pacientes;
- Correlacionar a expressão da proteína HIF-1 α com as características histopatológicas do tumor;
- Avaliar a relação da expressão da proteína HIF-1 α em linfócitos do infiltrado inflamatório peritumoral e intratumoral com o prognóstico dos pacientes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis em 10 de junho de 2008 (CEP n ° 619) e os participantes do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido sobre o trabalho (ANEXO I).

3.2. Casuística

A casuística foi composta de 56 pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral. Em relação à caracterização de sexo e idade, a casuística apresentou idade variando de 34 a 81 anos, com uma idade média de 56 anos ($dp \pm 11$ anos), sendo 48 (85,7%) do sexo masculino e 8 (14,3%) do sexo feminino. De acordo com a localização anatômica do tumor, 22 (39,3%) eram de língua, 10 (17,9%) de gengiva inferior, 20 (35,7%) de soalho de boca e 4 (7,1%) na área retromolar.

Os casos de câncer de lábio, tratamento cirúrgico anterior, tratamento por quimioterapia, metástases à distância, cirurgia sem a remoção dos linfonodos cervicais e margens cirúrgicas positivas foram considerados como critérios de exclusão.

3.3. Amostras

O material utilizado no presente trabalho foi constituído de 56 amostras de tecido tumoral e 44 margens cirúrgicas provenientes de pacientes operados com carcinoma epidermoide de cavidade oral. Todos os pacientes foram tratados cirurgicamente no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Heliópolis, São Paulo, no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2005 com seguimento clínico de pelo menos 48 meses após a cirurgia.

As lâminas histológicas foram revisadas por um patologista para confirmação histopatológica do diagnóstico. Os tumores foram classificados de acordo com o sistema TNM (3^a edição) (DESCHLER E DAY, 2008) e as regiões intratumorais mais significativas foram selecionadas para confecção de uma lâmina de *tissue microarray*, enquanto que as margens foram mantidas em lâminas em cortes convencionais.

3.4. Confecção da lâmina de *Tissue Microarray* (TMA)

A montagem da lâmina de *tissue microarray* foi realizada em colaboração com o Serviço de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo, e na lâmina foram depositados tecidos da região intratumoral dos casos de carcinoma epidermoide de cavidade oral.

As lâminas dos casos selecionados foram revisadas por coloração de HE (Hematoxilina Eosina) por um patologista, e foram escolhidas regiões representativas do tumor para perfuração dos blocos de parafina, chamados blocos doadores.

Esta etapa foi realizada em um aparelho preciso denominado *Tissue Arrayer* da marca Beecher Instruments® (Silver Spring MD). Os casos foram previamente

dispostos em ordem numérica crescente de acordo com o registro de prontuário do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Heliópolis, amostrados em duplicata e mapeados (ANEXO II).

A partir destes blocos doadores foram retirados fragmentos cilíndricos de 1mm de diâmetro, e estes fragmentos foram acondicionados em outro bloco de parafina, denominado bloco receptor. Cada caso foi representado no bloco receptor em duplicata.

Após a montagem do bloco receptor, o mesmo foi levado ao micrótomo para a obtenção de cortes histológicos sequenciais de 3µm os quais foram dispostos em lâminas adesivas da marca Microsystems Inc® para serem submetidas às reações de imuno-histoquímica.

3.5. Imuno-histoquímica

As amostras selecionadas para o estudo, lâminas de margens cirúrgicas e do *tissue microarray* foram submetidas a reações de imuno-histoquímica pela técnica de complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABC, DAKO®). Foi utilizado o anticorpo policlonal anti-HIF-1α (Millipore CorporationH®, USA), na diluição de 1:150.

Foram realizados controles positivo e negativos utilizando amostras com a expressão da HIF-1α previamente conhecida em tumor de mama conforme convencionado: um controle positivo, e três negativos, sendo o primeiro sem anticorpo primário, o segundo sem anticorpo secundário e o terceiro sem a reação de revelação. Para a revelação foi utilizada a 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma®), as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer e montadas com lamínula fixada com resina.

3.6. Análise de Expressão

As lâminas foram observadas por meio de microscopia de luz com aumento de 400 vezes, toda a região peritumoral foi selecionada para a análise de linfócitos imunorreativos e no caso dos tecidos no *tissue microarray*, todo o spot foi avaliado em duplicata e uma média obtida. Os casos discordantes foram reavaliados.

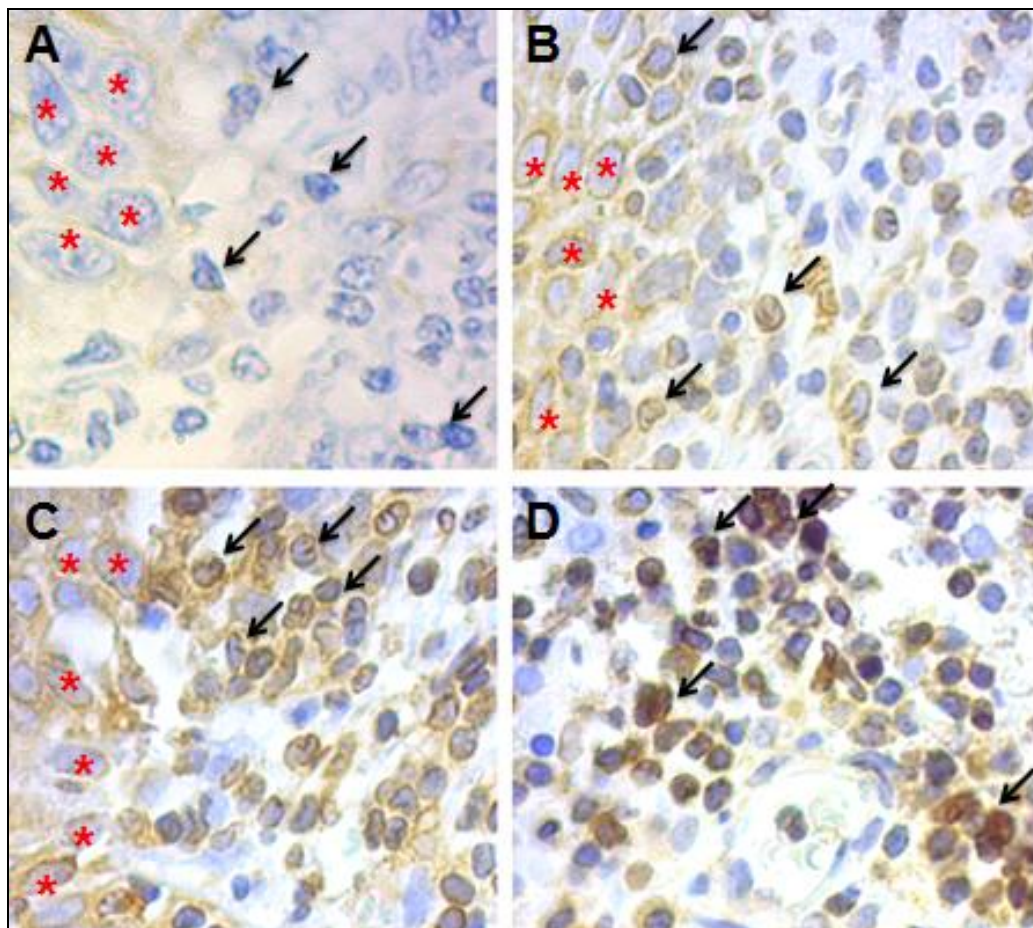


Figura 5 – Fotomicrografia com aumento de 400 vezes de margem cirúrgica de pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral. Tipos de intensidade de marcação de Linfócitos para a proteína HIF-1 α , com os linfócitos imunorreativos são marcados por setas e as células neoplásicas são marcadas por asteriscos. A) A figura apresenta alguns linfócitos sem marcação B) Linfócitos fracamente marcados C) Linfócitos moderadamente marcados D) Linfócitos fortemente marcados.

As células foram classificadas de forma semiquantitativa e escores foram atribuídos a cada tipo de classificação. A intensidade de marcação foi pontuada como negativa (0), fraca (1), moderada (2) e forte (3) (Figura 5). Considerando a porcentagem de células linfoides peritumorais e intratumorais imunorreativas para a HIF-1 α , a pontuação 0 foi dada quando todas as células eram negativas; 1 quando 1-25% das células eram positivas, 2 quando 25-50% das células eram positivas e 3 quando >50% das células eram positivas. Ambas as pontuações foram multiplicadas segundo (CAMPOS *et al.*, 2009; SOINI *et al.*, 2000) e o resultado das pontuações foi utilizado para categorizar a expressão da HIF-1 α em fraca (≤ 3) e forte (>3).

3.7. Análise Estatística

Foi utilizado o teste de qui quadrado e exato de Fisher para a realização de associação entre os dados, os quais foram confirmados pelo teste de Lilliefors (os resultados foram considerados significativos quando $p < 0.05$). Uma regressão logística multivariada foi utilizada para obter o odds ratio (OR) e intervalos de confiança (IC 95%).

A curva de sobrevida foi calculada pelo número de meses entre a cirurgia e a morte pela doença para cada paciente ou a última consulta. Para calcular a sobrevida livre de doença, o ponto final considerado foi a data recidiva da doença.

O modelo Kaplan-Meier foi utilizado para a análise de sobrevivência, o Wilcoxon foi usado para se obter o valor p e os riscos proporcionais de Cox para ajustar os valores de p e se obter o hazard ratio (HR). Para as análises multivariadas, foram incluídas em seu modelo as variáveis de relação conhecida para a característica testada. Os cálculos foram executados utilizando os programas Epi Info[®] v3.4.3, 2007 e Statsoft Statistica[®] v7.0.61.0.

4. RESULTADOS

4.1. Expressão de HIF-1 α no infiltrado inflamatório linfocitário peritumoral

A expressão da HIF-1 α foi estudada em 44 amostras de infiltrado inflamatório linfocitário peritumoral, tendo a expressão forte sido observada em 24 (54.5%) amostras e a fraca em 20 (45.5%) amostras (Figura 6 a e b). O hábito tabagista não esteve relacionado com a expressão da HIF-1 α ($p=0.952$) nestas células. A expressão de HIF-1 α não foi estatisticamente relacionada com o tamanho do tumor (0.529), linfonodos acometidos (0.226) e grau de diferenciação (0.942). (Tabela 1)

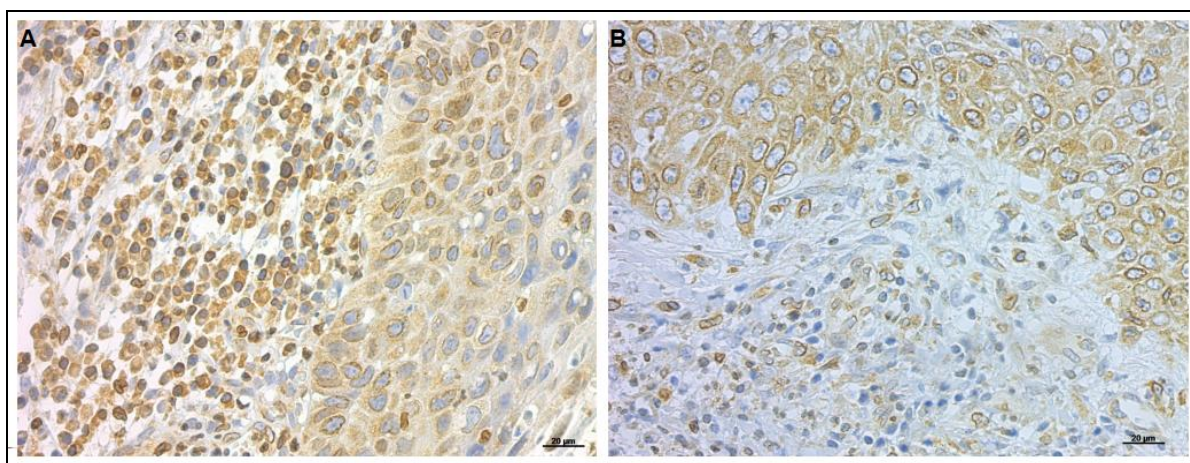


Figura 6 – Fotomicrografia de margem cirúrgica de carcinoma oral. A - expressão forte de HIF-1 α em células linfoides do infiltrado inflamatório peritumoral. B – expressão fraca de HIF-1 α em células linfoides do infiltrado peritumoral.

Os resultados da análise da expressão da HIF-1 α em linfócitos do infiltrado inflamatório peritumoral quando comparadas com recidiva e óbito mostraram que esta expressão foi significativamente associada com a ocorrência de recidiva e de óbito ($p=0.013$ e $p=0.016$, respectivamente).

Tabela 1 - Características clinicopatológicas e sua relação com a expressão da HIF-1 α nas células linfoides do infiltrado inflamatório, intratumoral e peritumoral.

Características Clinicopatológicas	Expressão HIF-1α nas células linfoides do infiltrado inflamatório													
	Peritumoral							Intratumoral						
	Total		Fraca		Forte		p	Total		Fraca		Forte		p
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)	
Tabagismo														
Não	13	29.5	7	29.2	6	30.0	0.952	14	25.0	14	32.6	0	0.0	0.013
Sim	31	70.5	17	70.8	14	70.0		42	75.0	29	67.4	13	100.0	
Tamanho do tumor (T) ^a														
T1+T2	21	47.7	12	50.0	9	45.0	0.529	24	42.9	16	37.2	8	61.5	0.290
T3	6	13.6	2	8.3	4	20.0		11	19.6	9	20.9	2	15.4	
T4	17	38.6	10	41.7	7	35.0		21	37.5	18	41.9	3	23.1	
Linfonodos (N) ^a														
Ausente	22	50.0	14	58.3	8	40.0	0.226	24	42.9	21	48.8	3	23.1	0.091
Presente	22	50.0	10	41.7	12	60.0		32	57.1	22	51.2	10	76.9	
Grau de diferenciação														
Bem	19	43.2	10	41.7	9	45.0	0.942	24	42.9	21	48.8	3	23.1	0.074
Moderado	21	47.7	12	50.0	9	45.0		28	50.0	18	41.9	10	76.9	
Pouco	4	9.1	2	8.3	2	10.0		4	7.1	4	9.3	0	0.0	
Recidiva														
Não	21	47.7	15	68.2	6	30.0	0.013	27	48.2	17	43.6	10	76.9	0.037
Sim	21	47.7	7	31.8	14	70.0		25	44.6	22	56.4	3	23.1	
Not available ^b	2	4.5						4	7.1					
Óbito														
Não	24	54.5	17	73.9	7	36.8	0.016	31	55.4	21	52.5	10	76.9	0.108
Sim	18	40.9	6	26.1	12	63.2		22	39.3	19	47.5	3	23.1	
Not available ^b	2	4.5						3	5.4					
Total	44	100.0	24	(54.5)	20	(45.5)		56	100	43	(76.8)	13	(23.2)	

^a Not available – Não foram considerados nos cálculos estatísticos.

^b TNM classification (3rd edition).

A análise multivariada revelou a expressão forte da HIF-1 α como um marcador para a ocorrência de recidiva e óbito pela doença (OR=5.75, CI=1.03-32.06 e OR=5.63, CI=1.09-28.98, respectivamente), podendo aumentar o risco dessas ocorrências em mais de cinco vezes, quando comparada a expressão fraca.

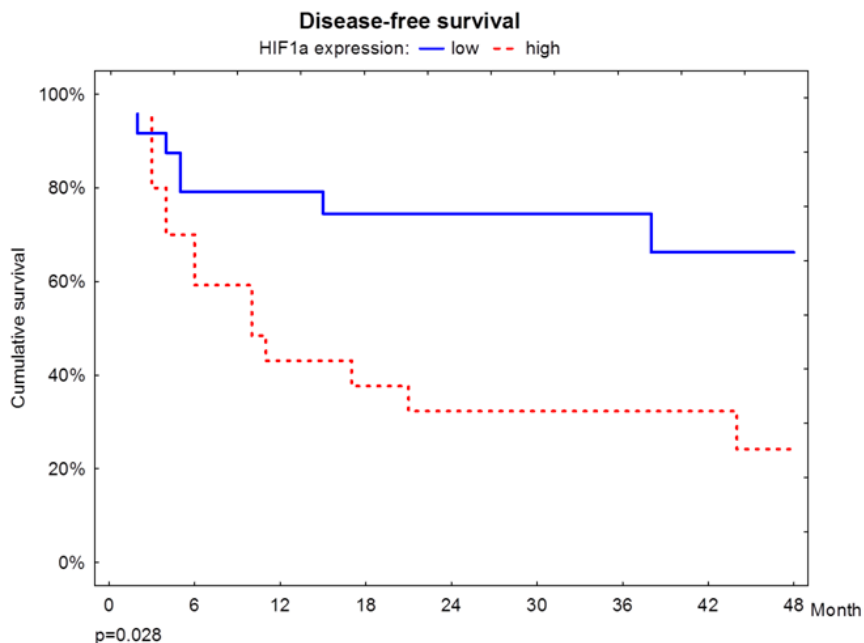


Figura 7 – Curva de sobrevida livre de doença segundo a expressão de HIF-1 α em células linfóides do infiltrado inflamatório peritumoral.

A expressão forte da HIF-1 α foi ainda relacionada com as piores sobrevidas livre de doença e doença específica (p=0.028 e p=0.008, respectivamente). No período de 24 meses após a cirurgia, cerca 20% dos pacientes com expressão fraca de HIF-1 α tiveram recidiva da doença e 10% morreram, enquanto que no mesmo período, 70% dos pacientes com expressão forte recidivaram e 60% morreram da doença em questão (Figura 7 e 8). A análise multivariada mostrou que a expressão forte da HIF-1 α é um fator independente para a pior sobrevida livre de doença e doença específica (HR=3.29; CI=1.10-9.86 e HR=3.88; CI=1.24-12.07, respectivamente), podendo aumentar o risco de ambas em mais de três vezes em comparação aos casos com a expressão fraca.

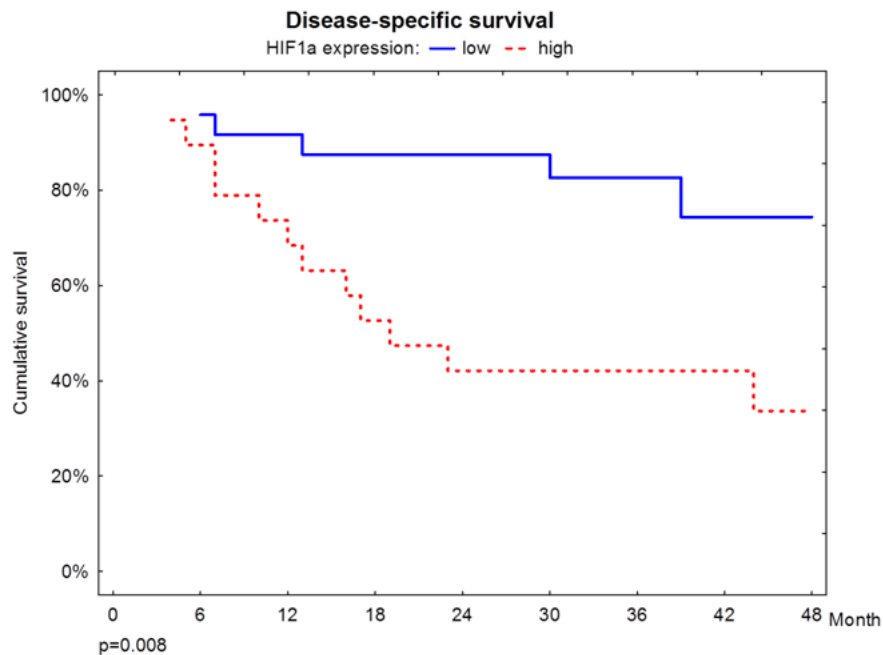


Figura 8 – Curva de sobrevida doença-específica de acordo com a expressão de HIF-1 α em células linfoides do infiltrado inflamatório peritumoral.

4.2. Expressão da HIF-1 α no infiltrado inflamatório linfocitário intratumoral

A expressão da HIF-1 α foi estudada em 56 amostras de infiltrado inflamatório linfocitário intratumoral, onde a expressão da HIF-1 α foi forte em 13 (23.2%) amostras e fraca em 43 (76.8%) amostras (Figura 9 a e b). A expressão da HIF-1 α foi significativamente relacionada com o hábito tabagista, onde a expressão forte foi detectada em todas as amostras provenientes de indivíduos tabagistas ($p=0.013$). Com relação às características clinicopatológicas, a expressão da HIF-1 α não mostrou associação significativa com o tamanho do tumor (0.290), linfonodos acometidos (0.091) e grau de diferenciação ($p=0.074$, Tabela 1).

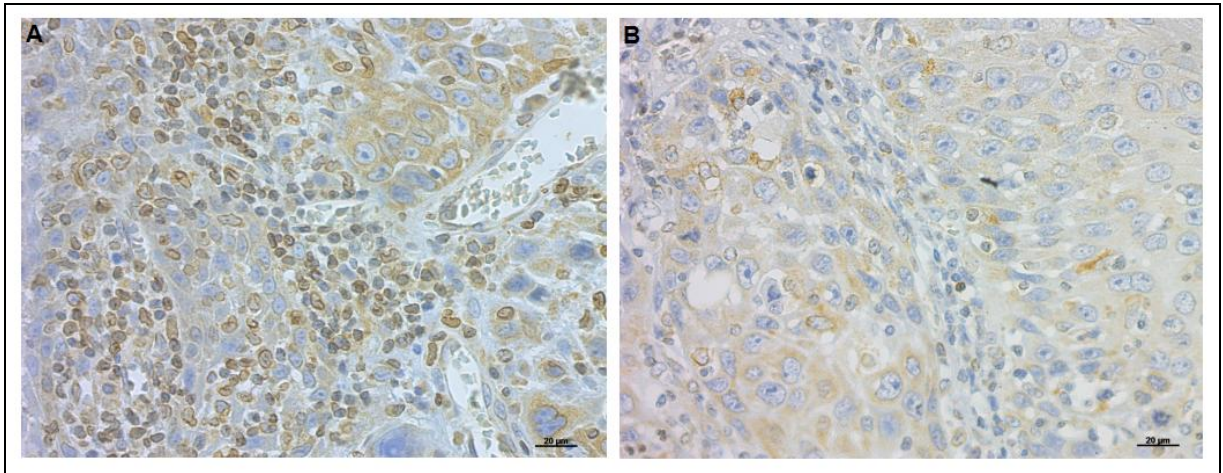


Figura 9 – Fotomicrografia de infiltrado inflamatório intratumoral. A - expressão forte de HIF-1 α em células linfoides do infiltrado inflamatório intratumoral. B – expressão fraca de HIF-1 α em células linfoides do infiltrado intratumoral.

A expressão da HIF-1 α não foi associada com a ocorrência de óbitos, mas foi significativamente relacionada a ocorrência de recidiva ($p=0.037$, Tabela 1). No entanto, a análise multivariada não confirmou a HIF-1 α como fator independente para a recorrência da doença (OR=9.73, CI 0.82-115.25).

Com relação à sobrevida dos pacientes, a expressão da HIF-1 α não mostrou relação com as sobrevidas livre de doença e doença específica ($p=0.102$ e $p=0.125$, respectivamente, Figura 10 e 11).

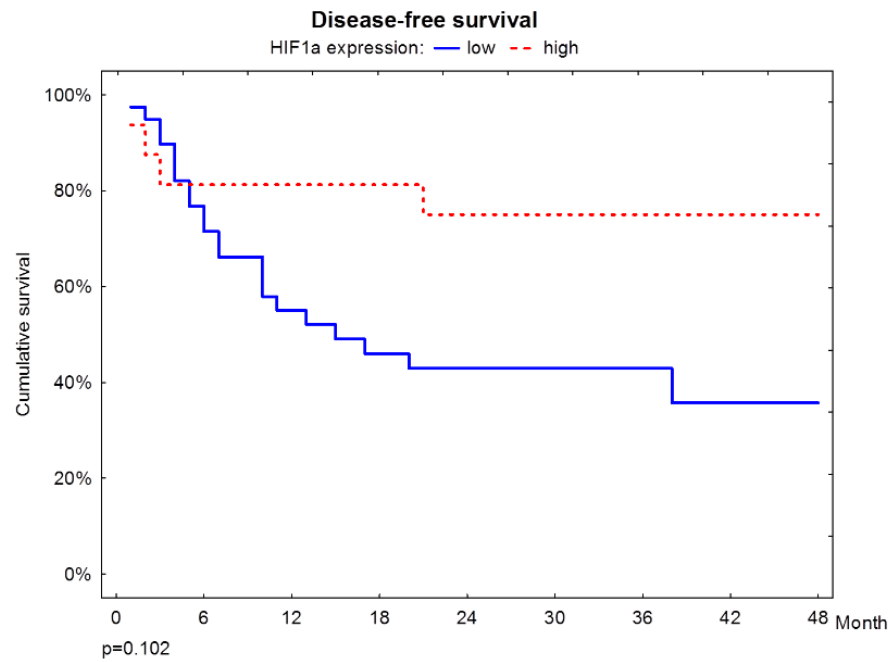


Figura 10 – Curva de sobrevida livre de doença segundo a expressão de HIF-1 α em células linfoides do infiltrado inflamatório intratumoral.

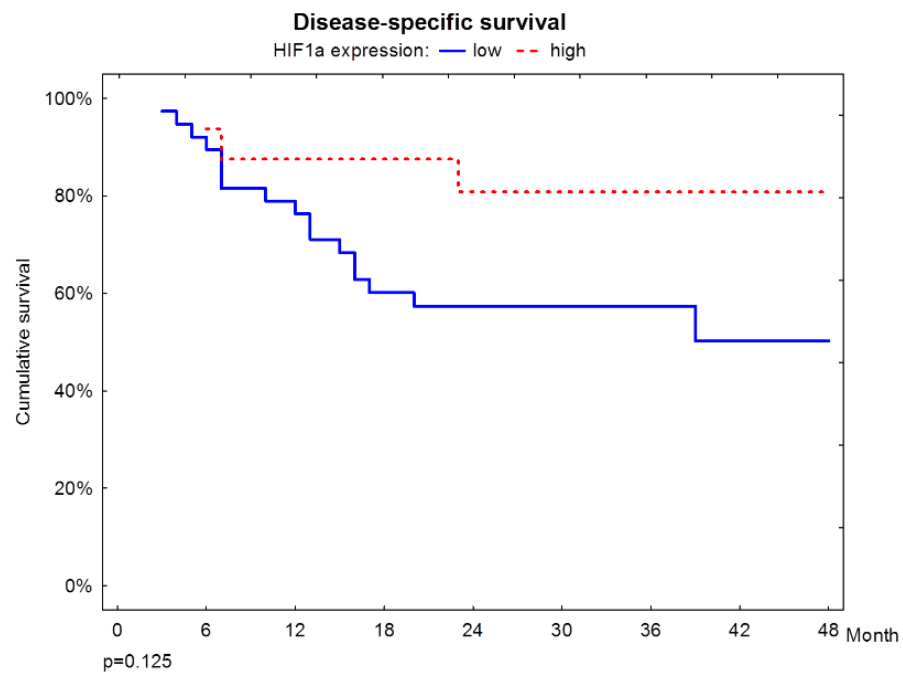


Figura 11 – Curva de sobrevida doença específica de acordo com a expressão de HIF-1 α em células linfoides do infiltrado inflamatório intratumoral.

4.3. Perfil HIF-1 α linfocitário

Baseado nos resultados e com o objetivo de testar o impacto da cumplicidade da expressão da HIF-1 α nos infiltrados inflamatórios intra e peritumoral no prognóstico dos pacientes, foi desenhado um perfil HIF-1 α linfocitário, segundo sua localização do infiltrado inflamatório em relação ao tumor. Desse modo, a expressão linfocitária da HIF-1 α foi categorizada em três classes, nomeadas em, baixo, intermediário e alto risco, conforme descrita na tabela 2.

Tabela 2 - Perfil de risco HIF-1 α e sua correlação com recidiva e morte.

Perfil HIF-1α linfocitário			Recidiva					Óbito				
			Não		Sim		p	Não		Sim		p
Risco	Peritumoral	Intratumoral	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
Baixo	Fraca	Forte	5	26.3	0	0.0	0.027	5	22.7	0	0.0	0.014
Intermediário	Fraca	Fraca	9	47.4	6	33.3		11	50.0	5	33.3	
Alto	Forte	Forte ou Fraca	5	26.3	12	66.7		6	27.3	10	66.7	

O perfil de risco demonstrou que os pacientes com expressão de HIF-1 α fraca no infiltrado inflamatório peritumoral e forte no infiltrado inflamatório intratumoral apresentava baixo risco de desenvolver recidiva tumoral ou óbito com 0% de ocorrência, já os pacientes de risco intermediário apresentaram expressão fraca no infiltrado peritumoral e intratumoral com um aumento de aproximadamente 33% de recidivas e óbitos, e por fim os indivíduos de alto risco com expressão forte no infiltrado inflamatório peritumoral, sendo que a expressão do infiltrado inflamatório intratumoral pode ser forte ou fraca, independentemente. Sendo que estes indivíduos de alto risco apresentam um risco de aproximadamente 66% de risco de apresentar recidiva e óbito.

O perfil HIF-1 α linfocitário foi significativamente associado com a ocorrência de recidiva e óbito pela doença ($p=0.027$ e 0.014 , respectivamente). Segundo os resultados, nenhum paciente classificado como baixo risco para o perfil HIF-1 α linfocitário apresentou recidiva ou óbito pelo câncer em questão, enquanto que

aproximadamente 70% dos casos classificados como alto risco tiveram recidiva da doença ou óbito (Tabela 2).

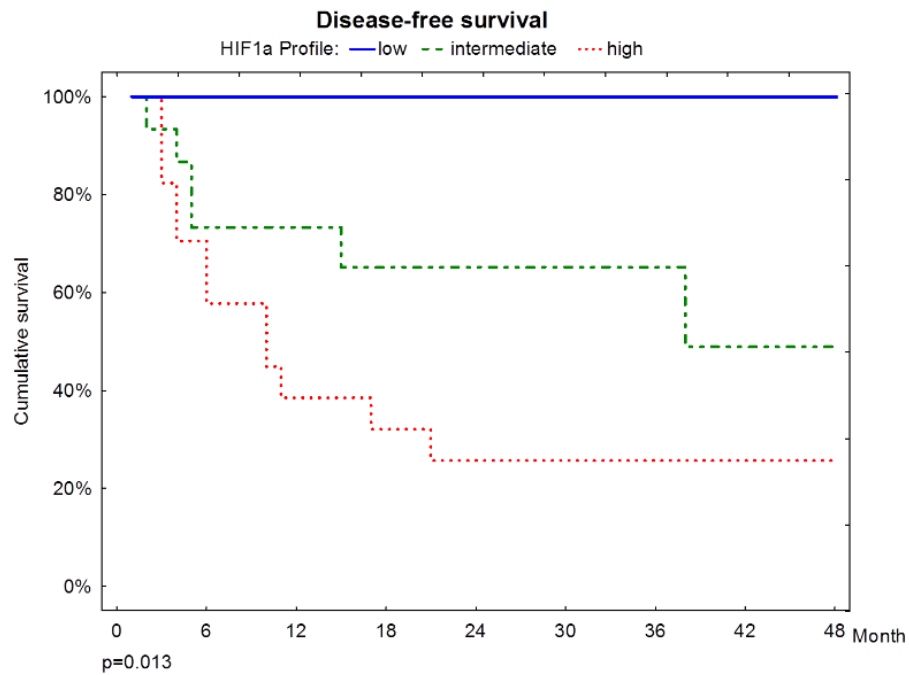


Figura 12 - Sobrevida livre de doença de acordo com o perfil de risco HIF-1 α .

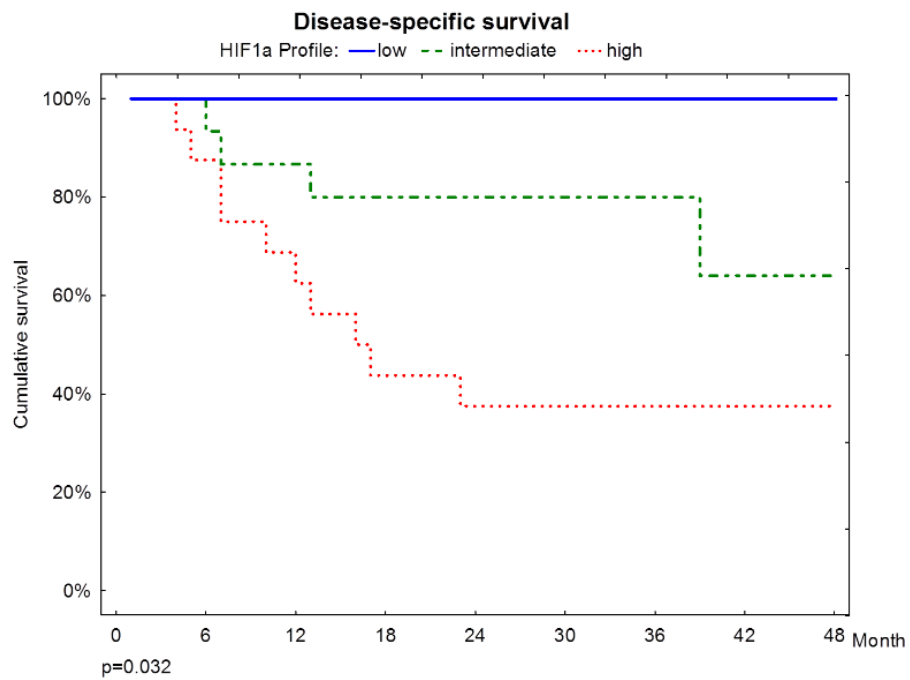


Figura 13 - Sobrevida doença específica de acordo com o perfil de risco HIF-1 α .

Com relação às sobrevidas livre de doença e doença específica, o perfil HIF-1 α linfocitário também se mostrou significativamente relacionado ($p=0.013$ e $p=0.032$, respectivamente). No período de 24 meses após a cirurgia, nenhum caso de recidiva ou óbito ocorreu entre os pacientes classificados como de baixo risco para o perfil HIF-1 α linfocitário, enquanto que cerca de 70% dos pacientes de alto risco para o perfil tiveram recidiva e 60% tiveram óbito pelo câncer (Figura 12 e 13).

4. DISCUSSÃO

Os resultados não mostraram correlação entre a expressão da HIF-1 α em linfócitos do infiltrado inflamatório peritumoral e o tamanho do tumor. Sabe-se que o aumento do tamanho do tumor provoca naturalmente uma condição de hipóxia, o que promove aumento da expressão da HIF-1 α (SEMENZA, 1999), no entanto os linfócitos da margem tumoral podem não ser influenciados apenas pela hipóxia tumoral, mas também pela expressão de citocinas presentes no microambiente inflamatório que ativa vias de expressão da HIF-1 α (SCHARTE *et al.*, 2003), além disso, o alto consumo de oxigênio nas regiões inflamatórias poderia causar o aumento da expressão desta proteína nos linfócitos analisados (DEHNE e BRUNNE, 2009).

Quando analisados os hábitos dos pacientes, os resultados mostraram que o hábito tabagista foi significativamente relacionado à expressão forte da proteína HIF-1 α , isto pode ser explicado com base nos dados de Chen e colaboradores (2001) em que o níquel pode atuar indiretamente sobre o DNA, estando relacionado à alteração na regulação da expressão gênica de vários genes. Este metal está presente em grandes concentrações no cigarro e pode substituir o núcleo metálico de algumas proteínas da família das dioxigenases ferro e 2-oxoglutarato-dependentes, como as PHDs (*HIF prolyl hidroxilase*) (CHEN *et al.*, 2009; SALNIKOW e ZHITKOVICH, 2008).

A proteína PHD possui um núcleo metálico preenchido pelo Fe (II) para seu perfeito funcionamento (CHEN *et al.*, 2009), entretanto, quando em grandes quantidades, o níquel apresenta maior afinidade pelo núcleo metálico da PHD podendo facilmente substituí-lo, o que resulta numa perda de função desta proteína, desta forma ela perde a capacidade de hidroxilar o domínio ODD da HIF-1 α , a qual mantém-se íntegra (SALNIKOW e ZHITKOVICH, 2008).

A expressão da proteína HIF-1 α em linfócitos do infiltrado inflamatório mostraram uma significativa relação com o prognóstico dos pacientes. Sabe-se que sistema imunológico apresenta um papel primordial na sobrevivência do organismo, inclusive de mantê-los em constante defesa contra células transformadas e destruí-las antes que se tornem tumores lesivos. O infiltrado inflamatório tumoral, observado em

vários tipos de tumor, possui um significado clínico melhor compreendido em tumores de mama e colorretais (MOHAMED *et al.*, 2012; TOUGERON *et al.*, 2013) sendo interpretados no laudo patológico como fatores prognóstico. Porém, em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, apesar de avaliado pelo patologista, o infiltrado inflamatório tumoral ainda não traz correlação clínica bem estabelecida.

A grande maioria dos estudos de pesquisa com câncer avalia e associa o prognóstico à expressão de HIF-1 α em células tumorais (KAYA *et al.*, 2012; DONG *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2012), não havendo na literatura avaliação da expressão da HIF-1 α em linfócitos do infiltrado inflamatório tumoral ou peritumoral em humanos. Essa questão mostra ser importante uma vez que células linfoides apresentam uma função de principal mecanismo no combate a células tumorais, além da importância da relação entre a expressão de HIF-1 α no microambiente tumoral e a supressão linfocitária (SITKOVSKY E LUKASHEV, 2005; THIEL *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos mostram que a avaliação da HIF-1 α no infiltrado inflamatório pode ser utilizada como fator prognóstico em tumores de cavidade oral devido à relação entre a forte expressão desta proteína nas células linfoides da margem peritumoral e o pior prognóstico dos pacientes. Este pior prognóstico esteve relacionado à recidiva loco regional, morte pela doença ($p=0.013$ e $p=0.016$) e aumento de risco de recidiva e óbito em mais de cinco vezes quando comparado com a expressão baixa da HIF-1 α . Além disso, a expressão forte da HIF-1 α mostrou ser um fator de risco independente para pior sobrevida livre de doença e sobrevida doença-específica (HR=3.29; CI=1.10-9.86 e HR=3.88; CI=1.24-12.07, respectivamente), com aumento de risco em mais de três vezes.

Estes dados podem ser apoiados pelos achados de Thiel *et al.*, 2007, o qual mostra que as células linfoides podem não exercer seu papel de defesa em caso de expressão forte da HIF-1 α . Nesse caso, apesar de presente, o infiltrado inflamatório pode estar suprimido e/ou apresentando atividade anti-inflamatória em virtude da expressão forte da HIF-1 α na margem peritumoral, podendo não ser efetivo no combate às células tumorais no tangente ao escape para recidiva loco regional.

Além disso, nossos dados sugerem que o papel do infiltrado inflamatório peritumoral parece ter um “efeito dominante” em relação ao infiltrado inflamatório intratumoral. Estudos com câncer de mama (MOHAMED *et al.*, 2012) também sugerem que o infiltrado inflamatório da margem tumoral possui um papel chave no combate ao tumor no hospedeiro.

Essa hipótese pode ser reforçada pelo resultado do perfil de risco, na qual a expressão fraca da HIF-1 α em linfócitos do infiltrado inflamatório peritumoral e forte em linfócitos do infiltrado inflamatório intratumoral representa o perfil de baixo risco e está associado ao melhor prognóstico sem nenhum caso de recidiva ou morte. A expressão fraca na margem e fraca no tumor aumenta o risco de recidiva e óbito em 33.3% com perfil intermediário de risco, já perfil de alto risco leva em consideração apenas a expressão forte da HIF-1 α na margem e independe da intensidade da expressão da mesma no infiltrado inflamatório intratumoral e eleva o risco em 66.7% tanto de recidiva tumoral, quanto de óbito do paciente. Esses dados mostram que o infiltrado inflamatório peritumoral deve apresentar uma maior efetividade no controle da disseminação loco regional da doença.

Outra questão importante é como explicar que a expressão da mesma proteína tem papel diferente nas células do infiltrado inflamatório do tumor e da margem. Nossa hipótese está relacionada às diferenças do microambiente tumoral e peritumoral.

No caso do tumor, sabemos que o microambiente hipóxico induz a estabilização da HIF-1 α que rapidamente ativa a expressão de VEGF e promoção da angiogênese (SEMENZA, 2012b), com aumento da vascularização e oxigenação do microambiente tumoral. Essa resposta poderá levar a uma melhor resposta ao tratamento, especialmente o radioterápico, como já descrito na literatura em câncer de cabeça e pescoço (SANTOS *et al.*, 2012). Além disso, estudos apontam que o aumento da expressão da HIF-1 α intratumoral pode ativar a cascata pró-inflamatória responsável pelo combate às células tumorais por meio da ativação de receptores para TNF (PALAZON *et al.*, 2012), desta forma, a expressão forte da HIF-1 α no infiltrado inflamatório intratumoral poderia contribuir para uma maior resposta antitumoral culminando num melhor prognóstico para o paciente.

Nossos achados abrem perspectiva da utilização da avaliação biológica da proteína HIF-1 α para aplicação prognóstica em pacientes com câncer e sugere novos alvos terapêuticos de desenvolvimento de drogas anti-cancer.

5. CONCLUSÕES

Não houve relação significativa entre as características clinico-epidemiológicas dos pacientes e histopatológicas do tumor com a expressão da HIF-1 α em linfócitos do infiltrado inflamatório peritumoral e intratumoral. No entanto esta expressão mostrou ser um importante marcador prognóstico tanto em linfócitos peritumorais como em linfócitos intratumorais, possibilitando também a criação de um perfil de risco para o prognóstico dos pacientes.

Os presentes resultados abrem perspectiva da utilização da avaliação biológica da proteína HIF-1 α para aplicação prognóstica em pacientes com câncer e sugere novas abordagens acerca do estudo do infiltrado inflamatório em tumores.

6. REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6ª edição, São Paulo, Elsevier Editora Ltda. 2007.

Alvarenga LM, Ruiz MT, Bertelli ECP et al. Avaliação epidemiológica de pacientes com cancer de cabeça e pescoço em um hospital universitário do noroeste do estado de São Paulo. *Ver Bras Otorrinolaringol*. 2008; 74(1): 68-73.

Baek JH, Mahon PC, Oh J, et al. OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor 1 α and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF-1 α . *Mol Cell*. 2005; 17: 503–512.

Bauman JE, Michel LS, Chung CH. New promising molecular targets in head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Opin Oncol*. 2012; 24: 235-242.

Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, et al. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res*. 2003; 63(8):1727-30.

Brenner S, Jeunon FA, Barbosa AA, et al. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2007; 53(1):63-69.

Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. 2001; 294:1337-40.

Bruick RK. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes Dev*. 2003; 17(21):2614-23.

Brune B, Zhou J. Nitric oxide and superoxide: interference with hypoxic signaling. *Cardiovasc*. 2007; 75 275–282.

Campos AH, Aldred VL, Ribeiro KC, et al. Role of immunoexpression of nitric oxide synthases by Hodgkin and Reed-Sternberg cells on apoptosis deregulation and on

clinical outcome of classical Hodgkin lymphoma. *Mol Cell Biochem.* 2009; 321: 95-102.

Carvalho MB, Lenzi J, Lehn CN. et al. Características clínico-epidemiológicas do Carcinoma Epidermóide de Cavidade oral no sexo feminino. *Ver AssMed Brasil.* 2001; 47 (3):208-14.

Chen H, Giri NC, Zhang R, et al. Nickel Ions Inhibit Histone Demethylase JMJD1A and DNA Repair Enzyme ABH2 by Replacing the Ferrous Iron in the Catalytic Centers. *Journal of Biological Chemistry,* 2009; 285(10):7374-7382.

Chowdhury R, Hardy A, Schofield CJ. The human oxygen sensing machinery and its manipulation. *Chem Soc Rev.* 2008; 37:1308–1319.

Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol.* 2009; 21:194-200.

Dehne N, Brune B. HIF-1 in the inflammatory microenvironment. *Exp. Cell.* 2009; 315:1791-1797.

Deschler DG, Day T. Pocket Guide to Neck Dissection and Classification and TNM Staging of Head and Neck Cancer. American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation. 2008; 28p.

Dong M, Wan X, Yuan ZY, et al. Low expression of Beclin 1 and elevated expression of HIF-1a refine distant metastasis risk and predict poor prognosis of ER-positive, HER2-negative breast cancer. *Med Oncol.* 2013; 30:355

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, et al. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* 2001; 107:43-54.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990; 61 (5): 759-67.

Forastiere A, Koch W, Trotti A, et al. Head & Neck Cancer. *The New England J of Med.* 2001; 345(26):1890-1990.

Gerald D, Berra E, Frapart YM, et al. JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell*. 2004; 118 781–794

Gillison ML. Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. *Head Neck*. 2007; 29(8):779-92.

Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, et al. Interleukin-1beta and tumor necrosis factoralpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood*. 1999; 94, 1561–1567.

INCA. Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2001, 47(4): 361-76

INCA, Instituto Nacional do Câncer. Estimativas 2008/09: incidência de câncer no Brasil. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Rio de Janeiro, Brasil. 2010; www.inca.gov.br.

INCA, Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Tipos de câncer, Boca. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Rio de Janeiro, Brasil. 2012; www.inca.gov.br.

Kaelin WG JR, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*. 2008; 30: 393–402.

Kaya AO, Gunel N, Benekli M, et al. Hypoxia inducible factor-1 alpha and carbonic anhydrase IX overexpression are associated with poor survival in breast cancer patients. *J Buon*. 2012; 17 (4) 663-8.

Lim YC, Choi EC. Surgery alone for squamous cell carcinoma of the oral cavity: survival rates, recurrence patterns, and salvage treatment. *Acta Otolaryngol*. 2008; 128: 1132– 1137.

Lourenço SQC, Schueler AF, Camisasca DR, et al. Classificações Histopatológicas para o Carcinoma de Células Escamosas da Cavidade Oral: Revisão de Sistemas Propostos. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2006; 53(3):325-33.

Macarthur M, Hold GL, El-Omar EM. Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of

gastrointestinal malignancy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004; 286: 515-520.

Machado ACP, Tavares PG, Anbinder AL, et al. Perfil epidemiológico, tratamento e sobrevida de pacientes com câncer bucal em Taubaté e região. *Ver. Biociências*. 2003; 9(4):1-6.

Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008; 454: 436-444.

Mehrotra R, Yadav S. Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian J Cancer*. 2006; 43(2):60-6.

Mendes SO, Santos Md, Peterle GT, et al. HIF-1alpha Expression Profile in Intratumoral and Peritumoral Inflammatory Cells as a Prognostic Marker for Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *PLoS ONE*. 2014; 9(1): e84923.

Miller CS, Henry RG, Rayens MK. Disparities in risk of and survival from oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003; 95(5):570-75.

Mohammed ZMA, Going JJ, Edwards J, et al. The role of the tumor inflammatory cell infiltrate in predicting recurrence and survival in patients with primary operable breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2012; 38: 943-955.

Palazón A, Martínez-Forero I, Teijeira A, et al. The HIF-1 α hypoxia response in tumor-infiltrating T lymphocytes induces functional CD137 (4-1BB) for immunotherapy. *Cancer Discov*. 2012; 2(7):608-23.

Patel SG, Shah JP. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for an uniformity among diversity. *CA Cancer J Clin*. 2005; 55:242-58.

Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, et al. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem*. 1997; 272:11205-14.

Rantanen K, Pursiheimo J, Högel H, et al. Prolyl Hydroxylase PHD3 Activates Oxygen-dependent Protein Aggregation. *Molecular Biology of the Cell*. 2008; 19:2231-2240.

Ruas JL, Poellinger L, Pereira T. Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 alpha-mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein. *J Biol Chem*. 2002; 277:38723-30.

Salnikow K, Blagosklonny MV, Ryan H, et al. Carcinogenic nickel induces genes involved with hypoxic stress. *Cancer Research*. 2000; 60(1): 38-41.

Salnikow K, Zhitkovich A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis nickel, arsenic and chromium. *Chem Res Toxicol*. 2008; 21(1):28-44.

Santos MD, Mercante AMDC, Louro ID, et al. HIF1-Alpha Expression Predicts Survival of Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *PLoS ONE*; 2012; 7(9): e45228.

Scharte M, Han X, Bertges DJ, et al. Cytokines induce HIF-1 DNA binding and the expression of HIF-1-dependent genes in cultured rat enterocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2003; 284, 373–384.

Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Bio*. 1999; 15: 551–78.

Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(10):721-32.

Semenza, GL. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell*. 2012a; 148(3):399-408.

Semenza, GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*. 2012b; 33(4):207-14.

Sitkovsky M, Lukashev D. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF-1 α and adenosine receptors. *Nat. Rev. Immunol*. 2005; 5: 712–721.

Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953; 5:963-8.

Soini Y, Kahlos K, Puhakka A, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in healthy pleura and in malignant mesothelioma. *Br J Cancer*. 2000; 3: 880-886.

Stiehl DP, Wirthner R, Köditz J, et al. Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels: evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system. *J Biol Chem*. 2006; 281(33):23482-91.

Szabo, G. Consequences of alcohol consumption on the host defence. *Alcohol & Alcoholism*. 1999; 34(6):830-41.

Thiel M, Caldwell CC, Kreth S, et al. Targeted Deletion of HIF-1a Gene in T Cells Prevents their Inhibition in Hypoxic Inflamed Tissues and Improves Septic Mice Survival. *PLoS ONE*. 2007; 2(9): e853.

Tougeron D, Maby P, Elie N, et al. Regulatory T Lymphocytes Are Associated with Less Aggressive Histologic Features in Microsatellite-Unstable Colorectal Cancers. *PLoS ONE*; 2013; 8(4): e61001.

Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:4304-8.

Ward E, Jemal A, Cokkinides V, et al. Cancer disparities by race/ethnicity and socioeconomic status. *CA Cancer J Clin*. 2004; 54(2):78-93.

Yadav GS, Donoghue M, Tauro, DP, et al. Intraoperative Imprint Evaluation of Surgical Margins in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Acta Cytologica*. 2013; 57:75-83.

Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia-inducible genes. *Cancer Res*. 1999; 59:5830-5.

ANEXO

ANEXO I – Aprovação do Presente Trabalho pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis, sob nº 619.



UGA I – UNIDADE DE GESTÃO ASSISTENCIAL – HOSPITAL HELIÓPOLIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

São Paulo, 10 de Junho de 2008.

APROVAÇÃO

Ao Prezado

Dr. Marcelo dos Santos

Vimos por meio desta informar que o projeto de pesquisa: "**Avaliação das proteínas HIF1a, PHD3 e iNOS como candidatas a marcadores de comportamento tumoral em pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe**", e seus demais documentos, registrado neste CEP sob nº 619, tendo como relator o Dr. Carlos N. Lehn, foi aprovado por este Comitê de Ética em pesquisa em: 10/06/2008.

Lembramos que é obrigatório o envio de relatório anual e final para este Comitê de Ética em Pesquisa.

Atenciosamente,

COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA
HOSPITAL HELIÓPOLIS
 Dr. Jozias de Andrade Sobrinho
 Coordenador


 Dr. Jozias de Andrade Sobrinho
COORDENADOR

ANEXO II – Mapa *Tissue Microarray* indicando os tecidos nas posições do mapa com a identificação de cada caso.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
1	Liver Core	2257 CP2/0118	2434 CP2/0003	2484 CP2/0008	2500 CP2/0010	2501 CP2/0013	2512 CP2/0015	2518 CP2/0012	2544 CP2/0018	2548 CP2/0019	2576 CP2/0023	3006 CP2/0036	3008 CP2/0029	3018 CP2/0032	3020 CP2/0039	3028 CP2/0028	1
2	3091 CP2/0040	3124 CP2/0081	3141 CP2/0047	3147 CP2/0060	3160 CP2/0074	3186 CP2/0075	3202 CP2/0071	3249 CP2/0087	3290 CP2/0099	3292 CP2/0093	3294 CP2/0094	3335 CP2/0109	3357 CP2/0114	3364 CP2/0116	3368 CP2/0115	3412 CP2/0113	2
3	3416 CP2/0120	3431 CP2/0117	3435 CP2/0121	3444 CP2/0130	3460 CP2/0125	3474 CP2/0122	3478 CP2/0152	3498 CP2/0144	3507 CP2/0132	3541 CP2/0147	3547 CP2/0133	3557 CP2/0149	3559 CP2/1030	3563 CP2/0135	3608 CP2/0165	4062 CP2/0168	3
4	4084 CP2/0169	4088 CP2/0170	4124 CP2/0166	4135 CP2/1002	4136 CP2/0195	4144 CP2/0177	4159 CP2/0181	4160 CP2/0176	4168 CP2/0182	4179 CP2/0188	4221 CP2/0185	4239 CP2/0196	4304 CP2/1003	4392 CP2/1006	4424 CP2/1010	4435 CP2/1012	4
5	4538 CP2/1033	4441 CP2/1008	4451 CP2/1022	4469 CP2/1019	4483 CP2/1021	4538 CP2/1033	4549 CP2/1032	4553 CP2/1036	4589 CP2/1031	4649 CP2/1041	4659 CP2/1043	4686 CP2/1044	5066 CP2/1050	5073 CP2/1051	5182 CP2/1076	5215 CP2/1069	5
6	5234 CP2/1065	5248 CP2/1071	5251 CP2/1074	5266 CP2/1073	5280 CP2/1080	5295 CP2/1083	5361 CP2/1089	5375 CP2/1091	5437 CP2/1099	5509 CP2/1112	5523 CP2/1104	5557 CP2/1109	5578 CP2/1111	5633 CP2/1114	5666 CP2/1120	5695 CP2/1113	6